

Title: Gene vaccine for anti SARS coronal virus and use thereof

Abstract:

Source: CN1449826A The present invention discloses a gene vaccine for resisting SARS coronavirus and its application, including eucaryotic expressino plasmid containing total or partial gene fragment of total-length gene sequence of SARS coronavirus S protein. The nucleotide sequence of coded SARS coronavirus S protein can be operatively connected with a promotor, then it can express the complete or partial polypeptide of the coded SARS coronavirus S protein in vivo. The described gene vaccine can be used for immunizing host including human body and rodent, for example mouse to make it produce specific protective body fluid immune and cell immune to resist the infection of SARS coronavirus. Said invention is good in stability, convenient in production and low in cost.

Family:	Publication number	Publication date	Application number	Application date
	CN1449826 A	20031022	CN20030128042	20030527

Priority: CN20030128042 20030527

Assignee(s): (std): UNIV WUHAN

Assignee(s): WUHAN UNIV

Inventor(s): (std): DING HONG ; YE KAI

Inventor(s): HONG DING ; KAI YE

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/215



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03128042.0

A61K 48/00 C12N 15/50
A61P 31/14 A61P 11/00

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1449826A

[22] 申请日 2003.5.27 [21] 申请号 03128042.0

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

[71] 申请人 武汉大学

代理人 王敏锋

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 叶 凯 丁 虹

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用，含有 SARS 冠状病毒 S 蛋白的全长基因序列的全部或部分基因片段的真核表达质粒；编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列可操作地连接于一个启动子序列后，以便体内表达所编码的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的完整或部分多肽。将所述基因疫苗用于包括人类和啮齿类动物如小鼠在内的宿主进行免疫，使其产生特异性保护性的体液免疫和细胞免疫，以抵抗引起非典型性肺炎传染病的 SARS 冠状病毒的感染。本发明稳定性好，生产方便，价格便宜，能诱导机体同时产生针对引起非典传染病的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的特异性体液免疫和细胞免疫，为治疗和预防非典型性肺炎提供了有效且价廉的疫苗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗，其特征在于含有 SARS 冠状病毒 S 蛋白的全长基因序列的全部或部分基因片段的真核表达质粒；编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列可操作地连接于一个启动子序列后，以便体内表达所编码的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的完整或部分多肽。

2、一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗，其特征在于包含编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因的部分片段或者完整片段，SARS 冠状病毒 S 蛋白的全长基因序列为：

atgtttat	tcttattatt	tcttactctc	actagtggta	gtgacc	ttga	ccgg	tg	gcacc	60	
actttt	gatg	atgttcaagc	tcctaattac	actcaacata	cttcatctat	gagggggg	ttt	tttctt	120	
tactat	cctg	atgaaat	ttt	tagatcagac	actcttatt	taactcagga	tttattt	ctt	180	
ccat	tttatt	cta	atgttac	agggttcat	actattaatc	atacg	tttgg	caacc	ctgtc	240
atac	cttta	agg	atgg	ttat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	300
tggg	tttttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	360
acta	atgttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	420
tctaa	accca	tgg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	480
ttc	gagtaca	tat	ctgtatgc	ctttcg	ctttcg	ctttcg	ctttcg	ctttcg	ctttcg	540
cactt	acgag	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	600
caac	ctat	atgt	atgttgc	tgtat	cttgc	cttgc	cttgc	cttgc	cttgc	660
aagt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	720
gct	caagaca	tttgg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	780
acat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	840
aatcc	acttg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	900
cagac	cttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	960
aactt	gtgt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1020
gagaga	aaaaaa	aaat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1080
ttttca	ac	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1140

aatgtctatg cagattctt tgttagtcaag ggagatgatg taagacaaaat agcgccagga	1200
caaactggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat ggggtgtgtc	1260
cttgcttggaa atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaataat	1320
aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc tttgagagag acatatctaa tgtgccttc	1380
tccccgtatg gcaaaccctt caccccacct gctcttaatt gttattggcc attaaatgat	1440
tatggttttt acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagttgt agtactttct	1500
tttgaacttt taaaatgcacc ggccacgggt tttggaccaa aattatccac tgaccttatt	1560
aagaaccagt gtgtcaattt taatttaat ggactcaactg gtactgggt gttaactcct	1620
tcttcaaaga gatttcaacc atttcaacaa ttggccgtg atgtttctga tttcactgat	1680
tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata tttagacattt caccttgcgc ttttgggggt	1740
gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcattctgaag ttgctgttct atatcaagat	1800
gttaactgca ctgatgttac tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc	1860
atataattcta ctggaaacaaa ttttccatgg actcaaggcag gctgtctt ataggagctgag	1920
catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttgc tgcttagttac	1980
catacagttt ctttattacg tagtactacg caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct	2040
tttagtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc tactaacttt	2100
tcaatttagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaaacctc cgtagattgt	2160
aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tttgtcttaatt tgcttctcca atatggtagc	2220
ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca	2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaatg tacaaaaccc caactttgaa atatttgggt	2340
ggttttaatt tttcacaaaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtctttatt	2400
gaggacttgc tcttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc	2460
gaatgcctag gtgatattaa tgcttagagat ctcatttgc tgcttagttt cgtttttttt	2520
acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt	2580
agtggtaactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctttca aatacccttt	2640
gctatgcaaa tggcatatacg gttcaatggc attggagttt cccaaaatgt tctctatgag	2700
aaccaaaaac aaatgccaa ccaatttaac aaggcgatca gtcaaattca agaattcactt	2760
acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttgc ttaaccagaa tgctcaagca	2820
ttaaacacac ttgttaaaca acttagctt aattttgggtt caatttcaag tgtgctaaat	2880
gatatcctt cgcgacttga taaagtcgag gcggaggtac aaattgacag gttaattaca	2940

ggcagacttc aaagcttca aacctatgt a cacaacaac taatcaggc tgctaaaatc	3000
agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa	3060
agagttgact tttgtggaaa gggctaccac cttatgtcct tcccaacaagc agccccgcat	3120
ggtgttgc tccatcatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt caccacagcg	3180
ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttccctcgtg aagggtttt tgtgttaat	3240
ggcacttctt gtttattac acagaggaac ttctttctc cacaataat tactacagac	3300
aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa cacagtttat	3360
gatcctctgc aacctgagct tgactcattc aaagaagagc tggacaagta cttcaaaaat	3420
catacatcac cagatgttga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc tgtcgtaac	3480
attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga atcactcatt	3540
gaccttcaag aattggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta tgttggctc	3600
ggcttcattt ctggactaat tgccatgtc atggttacaa tcttgcttgc ttgcattgact	3660
agttgttgc gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgggtt ctgcgtgcaa gtttgatgag	3720
gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt acacataa	3768

3、根据权利要求 1 所述的一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗，其特征在于所述的动子序列可以是人类立即早期巨细胞病毒的启动子，也可以使用其它常见启动子，包括组成型启动子，如肉瘤病毒 LTRs 和诱发型启动子，如金属硫蛋白启动子和组织特异性启动子。

4、权利要求 1 所述的一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗在预防和治疗非典型肺炎中的应用。

抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用

技术领域

本发明涉及预防和治疗由 SARS 冠状病毒引起的非典型性肺炎疫苗的领域，尤其涉及编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核酸序列的疫苗。还涉及该疫苗在抗 SARS 冠状病毒中的用途。

背景技术

称为非典型肺炎的严重急性呼吸综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 已经在全世界 20 多个国家和地区发生。据世界卫生组织统计，截至 5 月 22 日内瓦时间 17:00，来源全球累计报告病例 8046，死亡病例 682；全国内地累计报告非典型肺炎病例 5285 例，死亡 303 例。这场突如其来的灾难给全世界人民特别是中国人民带来了巨大的人员上和经济上的损失。

到 5 月 22 日为止，仅有改善症状的化学药物，如“西维来司钠”，用于改善全身性炎症反应综合症及特发性肺纤维化等引发的急性肺损伤，和提高机体免疫机能，如糖皮质激素，以及广谱抗病毒药物“基因工程人 ω 干扰素”，未见有特异性治疗和预防由 SARS 冠状病毒引起的非典型性肺炎的药物上市。这使得发展一种预防和治疗由 SARS 冠状病毒引起的非典型性肺炎的疫苗显得十分紧急和重要。

在疫苗的研制上，存在着三种选择。第一种方式是采用减毒或灭活的 SARS 冠状病毒制成的非典型性肺炎疫苗，它是将 SARS 冠状病毒通过物理或化学的方法减低或消除其感染性，然后直接作为疫苗使用。其仍然有毒力回复的潜在可能性，具有非常大的危险性。

第二种方式是采用基因工程蛋白质或多肽作为疫苗，是将 SARS 冠状病毒的部分抗原基因在酵母、大肠杆菌等细胞内表达，得到的蛋白质经过纯化作为疫苗。但是由于表达得到的蛋白往往不能得到正确的翻译后加工，使用该蛋白制成的疫苗的抗原性往往较差，不能使机体产生良好的保护性免疫反应；另外此种疫苗的主要成分是蛋白质，十分不稳定，需要在销售和运输中始终保持“冷链运输”，这大大增加了其生产成本，而且使该种疫苗有效率大大

降低。

而基因疫苗，是近几年发展起来的第三代疫苗。它是把外源基因克隆到真核表达载体上，然后将重组的载体基因直接注射到动物体内，使外源基因在活体内表达，产生的抗体激活机体的免疫系统，引发免疫应答。大量的实验结果表明，基因疫苗不仅可用于人类疾病，而且还可以广泛应用于人畜共患病和动植物疾病。基因疫苗不仅具有预防疾病的作用，同时还具有治疗疾病的作用。

与基因工程蛋白疫苗只能诱导机体产生体液免疫相比，基因疫苗能同时诱导机体产生强大的体液免疫和细胞免疫，这在诱导机体产生对抗病原体感染特别是病毒性感染中，具有很大的优势和应用前景——体液免疫所产生的抗体能中和血液和组织液中的病毒颗粒；而细胞免疫能使各类杀伤细胞识别并杀死被感染的宿主细胞，在病毒颗粒成熟之前就将其寄生的宿主细胞杀死，使得病毒无法扩增，释放，入侵未感染的宿主细胞，从而达到治疗的目的。

发明内容

本发明的目的在于提供一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗，该疫苗稳定，在常温下保存，能够方便地运输，储存，可同时引起人体针对 SARS 冠状病毒体液免疫和细胞免疫。

本发明的另一个目的在于提供一种抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗在预防和治疗非典型性肺炎中的应用。

本发明涉及多核苷酸，包括 DNA，进行免疫，使机体抵抗由 SARS 冠状病毒所引起的非典型性肺炎，涉及含有用于所述目的的基因疫苗中的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的全长基因或其片段。本发明中，构建了若干重组质粒，以便包括编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列。

本发明提供的技术方案实施步骤为：

- a. 采用基因合成的方法或通过 RT-PCR 从病人血清中扩增的方法得到 SARS 冠状病毒 S 蛋白部分或全长基因片段。
- b. 将 a 步骤所得到的基因片段插入到带有人类立即早期巨细胞病毒 (CMV) 的启动子，或其它类似真核表达启动子的商品化的真核表达载体中。
- c. 将所得到的带有 a 步骤所得到的基因片段的重组真核表达载体，使用限制性内切酶酶切方法或 PCR 方法经过鉴定。

- d. 在大肠杆菌中扩增 c 步得到的重组真核表达载体，去除其中的杂质，如宿主细菌染色体 DNA, RNA 和蛋白质。
- e. 将 d 步所得到的纯化的重组真核表达载体加入到合适的制剂中，如生理盐水，调节重组真核表达载体的浓度到合适的免疫用浓度，范围为 0-100mg/ml，即得到可用于本发明目的抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗。

编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列见序列表，本发明所涉及的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列包括表 1 所示的完整序列和其片段。

编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白的核苷酸序列可操作地连接于一个启动子序列后，以便体内表达所编码的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的完整或部分多肽。所述启动子序列可以是人类立即早期巨细胞病毒(CMV)的启动子，也可以使用任何其它常见启动子，包括组成型启动子，如肉瘤病毒 LTRs，和诱发型启动子，如金属硫蛋白启动子和组织特异性启动子。

运用本发明提供的技术方案得到含 SARS 冠状病毒 S 蛋白部分或全长基因序列的基因疫苗。其中含 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因序列的基因疫苗，即重组质粒 pCDNA-S 保存于大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α -pCDNA-S 中，CCTCC No: M203044。

上述重组真核表达质粒含有若干基本骨架单位：原核复制起始点 *fi origin* 和 *pPUC origin*；真核复制起始点 *SV40*；新霉素抗性基因；氨卡青霉素抗性基因；以及若干个具有免疫佐剂功能的非编码免疫刺激序列 (ISS)。

本发明与采用减毒和灭活疫苗制成的非典型性肺炎疫苗和基因工程蛋白质或多肽制成的非典型性肺炎疫苗相比，含 SARS 冠状病毒 S 蛋白基因片段的基因疫苗具有以下优点使其在预防和治疗由 SARS 冠状病毒引起的非典型性肺炎传染病中具有很大的优势：

- (1) 可同时引起人体针对 SARS 冠状病毒的体液免疫和细胞免疫。
- (2) 制备简便，省时省力。外源抗原基因很容易克隆进表达载体，数天内可以扩增并纯化。
- (3) 比较安全。含 SARS 冠状病毒 S 蛋白基因片段的基因疫苗接种后，在哺乳动物细胞内，能高水平表达病毒抗原基因，不涉及感染性因子，不依赖病毒颗粒的装配，避免了采用活病毒疫苗的危险。

(4) 可提供对多种病毒株的广谱有效的疫苗。由于载体本身不诱导免疫应答，因此可组建含有多种抗原 DNA 的基因疫苗联合接种免疫。

(5) 含 SARS 冠状病毒 S 蛋白基因片段的基因疫苗接种后，由于表达抗原蛋白的时间为 1-2 月，能强化 B 细胞和 T 细胞的记忆，引起持久的体液和细胞免疫应答。

(6) 含 SARS 冠状病毒 S 蛋白基因片段的基因疫苗较稳定，可以在常温下保存，能够方便的运输、储存。

(7) 价格便宜。

通过同源对比表明，SARS 冠状病毒 S 蛋白是介导 SARS 冠状病毒识别宿主细胞以及入侵过程中的膜融合过程的关键蛋白，与 SARS 冠状病毒入侵人体的致病过程密切相关。SARS 冠状病毒 S 蛋白位于病毒囊膜表面，在病毒入侵时介导病毒与宿主细胞膜表面受体的相互作用，并留在细胞表面，成为受病毒感染细胞的表面标志，从而成为抗体与淋巴细胞的攻击的靶点，因而可以用作非典型性肺炎预防与治疗的重要基因。运用生物信息学手段对 SARS 冠状病毒 S 蛋白基因片段的抗原性进行分析，结果表明其具有 A, B, C 三个抗原性评价值非常高的区域，其中 B, C 区位于 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S2 亚基的位于病毒外部的羧酸端多肽肽段中，长度分别为 130aa，其抗原性非常强，分别具有 4 个以上 MHCII 分子结合位点，是具有强抗原性的疫苗基因片段。将其中一个或两个抗原性良好的区域一起作为疫苗的抗原基因，所构建的疫苗可以引起机体产生强大的保护性免疫作用。

本发明制得的含 SARS 冠状病毒 S 蛋白的部分或全长氨基酸序列的基因疫苗具有热稳定性好，生产方便，价格便宜，能诱导人体产生针对引起非典传染病的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的特异性体液免疫和细胞免疫，从而起到预防和治疗由 SARS 冠状病毒所引起非典传染病的作用。

附图说明

图 1 为重组质粒 pCDNA-SARS-S2 的构建图。

具体实施方式

结合附图对本发明作进一步的详细描述：

1. 构建含 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp~3162bp 的核苷酸序列的真核表

达载体, SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因序列见表 2。

合成 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段, 然后通过 PCR 法以引物对:

5' ggggaattcgacatggaatcacttacaacaacatcaactgc 3'

5' cccggatcctactaagcttgcctggatggcacatacg 3'

为引物, 合成的 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段为模板, 扩增得到两端分别加上 EcoRI 和 BamHI 限制性酶切位点的 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段。PCR 反应总体积为 50 μ l, 反应条件为: 94°C 预变性 5 分钟; PCR 循环参数: 94°C 60 秒, 58°C 30 秒, 72°C 20 秒, 最后一次循环在 72°C 延伸 7 分钟。

然后用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 将该 PCR 产物和真核表达载体 pCDNA3.1 (-) 进行双酶切, 使两者两端成为粘端。其后于 16°C 在 T4 DNA 连接酶的作用下将两个片段连接起来, 连接产物转化处于感受态的大肠杆菌 DH5 α 。从转化平皿上挑取单菌落, 接种于 5mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基培养过夜。次日按 Sambrook 等人描述的小量碱法提取质粒 [Sambrook J, et al, 1989]。用限制性内切酶 EcoRI 作酶切鉴定, 选出含有片段较大的重组质粒, 然后用限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 作酶切鉴定, 挑出其中能切出 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段的重组质粒。按照前述给片段两端加上 EcoRI 和 BamHI 位点的 PCR 方法进行 PCR, 对含有 SARS S2 片段的重组质粒进一步鉴定, 将能够扩增出 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段的重组质粒定名为 pCDNA-SARS-S2。

2. 编码 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段的基因疫苗即重组质粒 pCDNA-SARS-S2 免疫制剂及阳性对照样品和阴性对照样品的制备

以重组质粒 pCDNA-SARS-S2 为 SARS 冠状病毒基因疫苗候选样品;

以带有乙肝表面抗原的真核表达质粒 pCMV-S 为阳性对照;

以不含有 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段的空载体 pCDNA3.1 (-) 为阴性对照;

以 0.9% 生理盐水为另一阴性对照；

将含有各质粒的重组大肠杆菌按 Sambrook 等人描述的小量碱法按等比例扩大提取 200mL 培养液中的质粒 [Sambrook J, et al, 1989]。在用 RNaseA 消化 RNA 后，依次用酚、酚：氯仿、氯仿抽提去除蛋白质。往上清中加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠，两倍体积无水乙醇，-20℃ 沉淀过夜。次日，10000g 离心 15min 收获质粒。经洗涤干燥后用生理盐水溶解。用分光光度计，测定 A260/A280 比值确定质粒纯度，A260 值确定样品的浓度，用生理盐水调节浓度至 1.0 μg/μL，作为 DNA 免疫注射样品。

3. 以四种免疫方式进行免疫 BALB/c 小鼠

四种免疫方式为：a. 肌肉注射；b. 基因枪皮下注射；c. 喷雾剂鼻腔粘膜免疫；d. 基因枪皮下注射初次免疫，喷雾剂鼻腔粘膜加强

每种免疫方式选取 40 只六周龄雌性 BALB/c 小白鼠，其中 10 只作为阴性对照组以生理盐水免疫，10 只作为阳性对照组以重组质粒 pCMV-S 免疫，10 只作为试验组以重组质粒 pCDNA-SARS-S2 免疫；10 只作为阴性对照组以空载体 pCDNA3.1(-) 免疫。每只注射 100 μgDNA 免疫注射样品。初次免疫十四天后，再次加强免疫一次。加强免疫两次后隔七天眼眶采小鼠外周血，加肝素抗凝。

4. 免疫效果的检测

BALB/c 小鼠在接受免疫后第 7, 14, 21, 28, 35 天，通过定量 PCR 检测小鼠机体内质粒存在状况，通过免疫印迹检测目的抗原表达状况，通过 ELISA 检测体液免疫状况，通过流式细胞仪检测小鼠 CD4+T 淋巴细胞和 CD8+T 淋巴细胞状况以评价特异性细胞免疫状况。

结果表明 BALB/c 小鼠在接受多种方式的免疫后，在不同程度上都能在较长时间内在机体内保留基因疫苗即重组质粒，并表达重组质粒中的 SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因片段，使小鼠机体产生针对 SARS 冠状病毒 S 蛋白的细胞免疫和体液免疫，使小鼠获得对抗引起非典型性肺炎的 SARS 冠状病毒感染的保护性免疫。

序 列 表

表 1 SARS 冠状病毒 S 蛋白的完整基因序列表

<110> 武汉大学
 <120> 抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用
 <130> 抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 3768
 <212> DNA
 <213> SARS coronavirus
 <300>
 <301> Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A.,
 <302> The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus
 <303> Science
 <304> 2003
 <305> 0
 <306> 13
 <307> 2003-05-01
 <308> GI:29836496
 <309> 2003-05-22
 <313> (1)..(3768)
 <400> 1

atgtttattt tcttattttt tcttactctc actagtggta gtgaccttga ccgggtgcacc	60
actttttagt atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat gaggggggtt	120
tactatcctg atgaaatttt tagatcagac actctttatt taactcagga tttatttctt	180
ccattttatt ctaatgttac agggtttcat actattaatc atacgtttgg caaccctgtc	240
atacctttta aggatggat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt tgtccgtggt	300
tgggtttttt gttctaccat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct	360

actaatgtt	ttatacgac	atgtacttt	gaattgtgt	acaaccctt	cttgctgtt	420		
tctaaaccca	tggcacaca	gacacatact	atgatattcg	ataatgcatt	taattgcact	480		
ttcgagta	tatctgatgc	ctttcgctt	gatgttcag	aaaagtca	gg taatttaaa	540		
cacttacgag	agtttgcgtt	taaaaataaa	gatgggttc	tctatgtt	taaggcata	600		
caacctatag	atgttagttcg	tgatctac	tctggttt	acactt	gaa acctat	660		
aagtgcctc	ttggattaa	cattacaaat	tttagagcca	ttcttacagc	ctttcac	720		
gctcaagaca	tttggggcac	gtcagctgca	gcctat	ttggctat	ttt aaagccaact	780		
acatttatgc	tcaagtatga	tgaaaatgg	acaatcacag	atgctgtt	ga ttgttctcaa	840		
aatccactt	gctgaactcaa	atgctgtt	aagagctt	agattgacaa	aggaaattac	900		
cagac	cctcta	atttcagggt	tgtccctca	ggagatgtt	tgagattccc	960		
aacttgc	ttttggaga	ggttttaat	gctactaaat	tccctctgt	ctatgcatt	1020		
gagagaaaaa	aaatttctaa	ttgtgttgc	gattactct	tgctctacaa	ctcaacattt	1080		
tttcaac	cttaagtgc	tggcg	tttct	gccacta	agt tgaatgatct	ttgttctcc	1140	
aatgtctat	gagattctt	tgt	tagtcaag	ggagatgt	taagacaaat	agcgc	1200	
caaactgg	ttattgct	ga	ttataatt	aaattgc	atgattcat	gggttgc	1260	
cttgc	tttgg	atactaggaa	cattgatgc	acttcaact	gtaattataa	ttataaata	1320	
aggtatctt	gacatgg	caa	gtttaggccc	ttt	gagagag	acatatactaa	tgtgc	1380
tccctgat	gcaaa	ccctt	ccccac	ctt	gctctt	attaaatgat	ttt	1440
tatgg	tttt	acacc	actac	tgg	cattggc	taccaac	tac	1500
tttgaactt	taaatgc	acc	ggccac	gg	tgttgc	tttgc	aaatttccac	1560
aagaacc	gtgtca	attt	taat	tttgc	act	ggactca	act	1620
tcttcaa	aga	gatttca	acc	tttgc	gt	actgg	gttactc	1680
tccgttgc	gag	atc	ctaaaac	atc	tttgc	tttgc	tttgggg	1740
gtaagtgt	aa	ttacac	ctgg	aa	tttgc	tttgc	tttgc	1800
gttactgca	ctgatgtt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1860
atata	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1920
catgtcgac	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1980
catacagtt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	2040
ttagg	gt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	2100
tcaatt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	2160

aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tggcttaatt tgcttctcca atatggtagc	2220
ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca	2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaacaaatcc caactttgaa atatttgggt	2340
ggtttaatt tttcacaaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtcctttatt	2400
gaggacttgc tcitataaa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc	2460
aatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatttgcg cgcagaagtt caatggactt	2520
acagtgtgc caccctgtc cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt	2580
agtggtaactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctttca aataccctt	2640
gctatgcaaa tggcatatacg tttcaatggc attggagttt cccaaaatgt tctctatgag	2700
aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgattt gtcaaattca agaatcactt	2760
acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgtt ttaaccagaa tgctcaagca	2820
ttaaacacac ttgttaaaca acttagctt aattttgggtt caatttcaag tgtgctaaat	2880
gatatcctt cgcgacttgc taaagtcgag gcgagggtac aaattgacag gttaattaca	2940
ggcagacttc aaagccttca aacctatgtt acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc	3000
agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa	3060
agagttgact ttgtggaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc agccccgcat	3120
ggtgtgtct tcctacatgt cacgtatgtt ccatcccagg agaggaactt caccacagcg	3180
ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttccctcggtt aaggttttt tgtgtttat	3240
ggcacttctt gtttattac acagaggaac ttctttctc cacaataat tactacagac	3300
aatacatttgc tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa cacagttat	3360
gatccctgtc aacctgagct tgactcattt aaagaagagc tggacaagta cttcaaaaat	3420
catacatcac cagatgttgc tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc tgtcgtaac	3480
attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga atcaacttatt	3540
gacctcaag aattggggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta tggtggctc	3600
ggcttcattt ctggactaat tgccatgtc atggttacaa tcttgccttgc ttgcattact	3660
agttgttgcg gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgggtt ctgtgcaaa gtttgcatt	3720
gatgactctg agccagttctt caaggggtgtc aaattacattt acacataaa	3768

表 2

SARS 冠状病毒 S 蛋白全长基因片段的 2752bp-3162bp 的基因序列表

<110> 武汉大学
 <120> 抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用
 <130> 抗 SARS 冠状病毒的基因疫苗及应用
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> SARS coronavirus
 <300>
 <301> Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A.,
 <302> The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus
 <303> Science
 <304> 2003
 <305> 0
 <306> 13
 <307> 2003-05-01
 <308> GI:29836496
 <309> 2003-05-22
 <313> (1)..(411)
 <400> 1

 gaatcaactta caacaacatc aactgcattg ggcaagctgc aagacgttgt taaccagaat 60
 gctcaagcat taaacacact tgttaaacaa cttagctcta atttgggtgc aatttcaagt 120
 gtgctaaatg atatccttgc gcgacttgat aaagtgcagg cggaggtaca aattgacagg 180
 ttaattacag gcagacttca aagccttcaa acctatgtaa cacaacaact aatcagggct 240
 gctgaaatca gggcttctgc taatcttgct gctactaaaa tgtctgagtg tggttcttgg 300
 caatcaaaaa gagttgactt ttgtggaaag ggctaccacc ttatgtcctt cccacacaagca 360
 gccccgcatg gtgttgcctt cctacatgtc acgtatgtgc catcccagga g 411

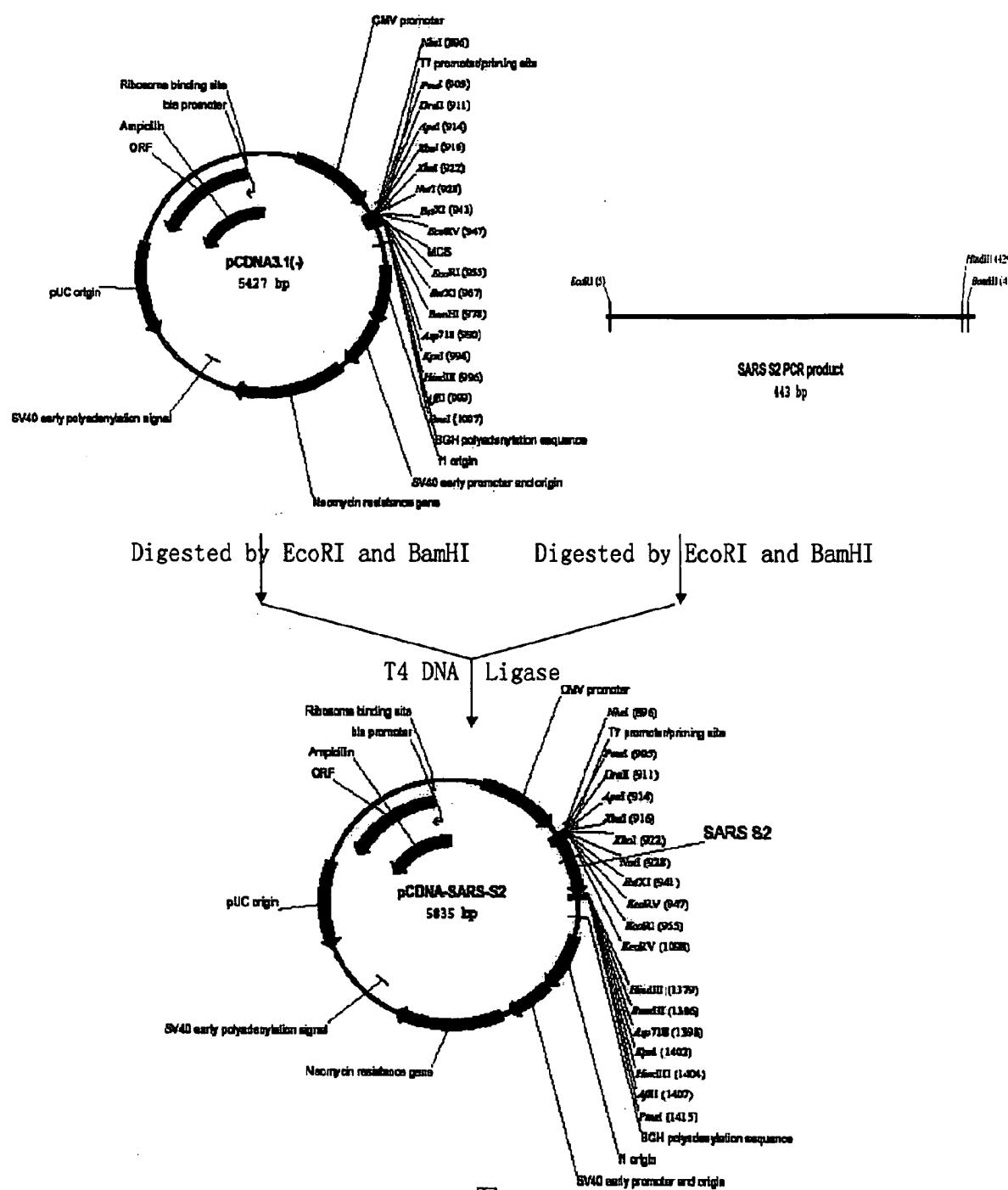


图 1